

03 FEV. 2005



REC'D 11 FEB 2005

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **07 DEC. 2004**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**DOCUMENT DE
PRIORITÉ**

**PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA RÈGLE
17.1. a) OU b)**

**INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE**

SIEGE

26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr





26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

1er dépôt

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*02

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 010801

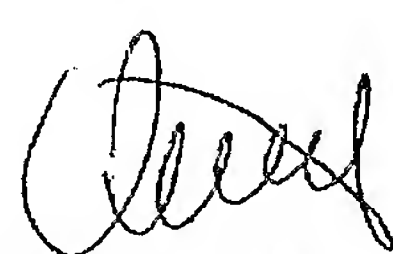
REMISE DES PIÈCES DATE 5 DEC 2003 LIEU 75 INPI PARIS 34 SP N° D'ENREGISTREMENT 0314299 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 05 DEC. 2003 DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET BEAU DE LOMENIE 158, rue de l'Université 75340 PARIS CEDEX 07	
Vos références pour ce dossier (facultatif) 3H263520/2/MN			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Procédé de purification du corail			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		BIOCORAL, INC	
Prénoms			
Forme juridique		Société de l'Etat du Delaware	
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège	Rue	9 East Loockerman Street	
	Code postal et ville	11111 Dover - Delaware 19901	
	Pays	ETATS-UNIS D'AMERIQUE	
Nationalité		Américaine	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
		<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2^{ème} page

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES DATE 5 DEC 2003 LIEU 75 INPI PARIS 34 SP N° D'ENREGISTREMENT 0314299 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI 3H263520/2/MN DB 540 W / 210502
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu) Nom Prénom Cabinet ou Société N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue Code postal et ville Pays N° de téléphone (facultatif) N° de télécopie (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		
7 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)		
8 RAPPORT DE RECHERCHE Établissement immédiat ou établissement différé Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG		
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS <input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences		
Le support électronique de données est joint La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) NEVANT Marc CPI n° 98.0509		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 

La présente invention concerne un procédé de purification du corail, ainsi que le corail obtenu par ce procédé.

L'invention trouve notamment application dans le domaine médical.

Le corail, qui présente une structure poreuse, est composé majoritairement
5 de carbonate de calcium, sous forme aragonite, le reste étant constitué d'oxydes de magnésium et de fer ainsi que de substances organiques responsables de sa couleur. Sa dureté varie de 2,5 à 3,5 sur l'échelle de Mohs.

Il existe à ce jour plusieurs substituts osseux à base de corail autorisés par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS). Un de
10 ces produits, commercialisé par la Société INOTEB sous la dénomination BIOCORAL®, est obtenu par traitement du corail à la surface de ses pores, ce qui permet d'éliminer une partie des substances organiques mentionnées ci-dessus.

Une analyse morphologique plus poussée du corail (microscopie électronique à balayage et thermique couplée à la spectroscopie de masse)
15 montre toutefois que lesdites substances organiques sont présentes non seulement dans les pores du corail, mais également aux joints de grains des particules de carbonate de calcium. Le traitement mis en place pour le produit BIOCORAL®, ne permet pas d'extraire les substances organiques localisées aux joints de grains, qui représentent environ 90 % de la totalité des substances
20 organiques.

Un problème que vise à résoudre la présente invention est donc de disposer de corail qui puisse être utilisé pour fabriquer des substituts osseux de qualité comparable à celle des implants synthétiques existants.

Un autre problème que vise à résoudre l'invention est de disposer d'un
25 procédé qui permette d'éliminer les substances organiques présentes dans le corail sans modifier la structure cristalline de ce dernier.

Il a maintenant été découvert, et c'est le fondement de l'invention, que le traitement du corail par un fluide en conditions supercritiques permet d'apporter une solution aux problèmes énoncés ci-dessus.

30 Ainsi, selon un premier aspect, l'invention a pour objet un procédé d'extraction de substances organiques présentes dans le corail, qui consiste à traiter le corail par un fluide à une température inférieure à 270° C, de

préférence inférieure ou égale à 260° C, et de préférence encore inférieure ou égale à 250° C.

Selon le procédé de l'invention, on utilise donc un fluide particulier dans des conditions dites "supercritiques", c'est-à-dire que le fluide possède les propriétés invasives d'un gaz tout en se comportant comme un liquide. De ce fait, le fluide est capable de diffuser dans la structure poreuse du corail sans aucun problème de mouillabilité, ce qui permet d'optimiser l'extraction des substances organiques (que l'on désignera également par la suite par "matrice organique") présentes dans le corail.

Le fluide susceptible d'être utilisé dans le procédé de l'invention doit avoir une température critique inférieure à 270° C, de préférence inférieure ou égale à 260° C, et de préférence encore inférieure ou égale à 250° C. A titre d'exemple, on peut citer l'éthanol, l'acétone, le dioxyde de carbone, ou un mélange de fluides qui possède une température critique inférieure aux valeurs mentionnées ci-dessus. On peut ainsi envisager d'utiliser un mélange d'éthanol et d'eau dans des proportions telles que la température critique du mélange remplit bien les conditions énoncées ci-dessus. Avantageusement, on utilise de l'éthanol du fait de la disponibilité de ce produit et de son caractère peu onéreux et non-toxique.

Le procédé de l'invention est mis en œuvre à une pression supérieure à la pression critique du fluide ou du mélange de fluides utilisé. De ce point de vue, la pression critique des fluides mentionnés ci-dessus, est facilement accessible. Généralement, on met en œuvre le procédé à une pression comprise entre environ 100 MPa et 300 MPa, de préférence entre environ 120 MPa et 250 MPa.

La durée du traitement n'est pas critique en soi et varie généralement entre quelques minutes et quelques heures, en fonction du fluide utilisé. Il est par exemple possible de traiter le corail pendant une durée comprise entre environ 15 min. et 1 h.

Selon un second aspect, l'invention concerne le corail substantiellement exempt de substances organiques, tel qu'obtenu par le procédé décrit ci-dessus.

Par "corail substantiellement exempt de substances organiques", on entend du corail contenant au moins deux fois moins de substances organiques que le corail non traité.

Selon un troisième aspect, l'invention concerne les substituts osseux réalisés à partir de corail substantiellement exempt de substances organiques. Ces substituts osseux peuvent être obtenus par des méthodes bien connues de l'homme du métier.

5 L'invention va maintenant être illustrée à l'aide des exemples ci-après.

Exemple 1 : Traitement supercritique du corail

Le corail brut (Porites Lutéa ; forme aragonite) est traité dans un dispositif de génération de haute pression d'eau dans une enceinte ayant un volume fixé. Celle-ci, réalisée dans un alliage à hautes caractéristiques
10 mécaniques, a une profondeur de 229 mm, un diamètre interne de 55 mm. Elle est fermée par un obturateur en forme de champignon supportant le joint métallique qui assure l'étanchéité par sa déformation. L'étanchéité au démarrage (sans pression dans l'autoclave) est réalisée par la remontée de l'obturateur, à l'aide de 8 vis dans la partie supérieure. La pression appliquée dans l'enceinte par
15 la pompe ou la température va comprimer le joint qui va de lui-même rendre étanche le système.

La température est mesurée à l'intérieur de l'enceinte par un thermocouple monté dans la partie haute du réacteur. Il est en contact direct avec le fluide sous pression.

20 Le corail est placé dans des flacons souples de 20 ml en Téflon PFA (Réf. M77400, Fisher Bioblock Scientific) résistant à des températures avoisinant les 300 °C et supportant la déformation due à la pression. La pression s'exerçant sur les parois internes et externes du flacon est la même. En effet, le flacon ne contenant pas ou très peu d'air, le liquide présent à l'intérieur du flacon et le
25 liquide transmetteur (eau) sont à la même pression, la paroi est donc comme « invisible » et ne subit qu'une légère déformation due à la compressibilité de l'eau. Le traitement s'effectue en présence d'éthanol comme fluide "supercritique", à une température de 230° C sous une pression de 100 à 300 MPa, pendant 1 h.

30 **Exemple 2 : Détermination de la quantité de substances organiques résiduelles dans le corail traité**

L'échantillon obtenu à l'exemple 1 est broyé au mortier et pesé (masse MB - matière brute - d'environ 3 g). On prélève 3 g de la poudre obtenue que

l'on dissous dans 135 ml d'HCl 0,1 N, sous agitation pendant 1 h. La solution ainsi obtenue est dialysée sur une membrane de poids moléculaire 12 000 à 16 000 (référence MCWO), puis congelée à -80°C et lyophilisée. Le lyophilisat est à son tour pesé (masse MO – matière organique – d'environ 3 g).

5 A titre de comparaison, la même expérience est réalisée sur un échantillon de corail brut (aragonite) et sur un échantillon de produit BIOCORAL®.

La figure 1 représente le rapport MO/MB pour chacun des trois échantillons. On peut constater que le traitement "supercritique" selon l'invention permet d'obtenir du corail contenant environ deux fois moins de substances
10 organiques que le produit BIOCORAL®.

Exemple 3 : Détermination de la quantité de protéines résiduelles dans le corail traité

1/ Préparation de la solution de travail et des échantillons :

- On mélange 50 volumes de la solution A avec 1 volume de la solution
15 B. La solution de travail est légèrement trouble au début, puis rapidement elle s'éclaircit avec agitation douce au vortex. Sa couleur est vert opalescent.
- On broye les échantillons au mortier et on pèse la poudre obtenue.
- On dissout 1 g de poudre dans 45 ml d'HCL à 0,6 N pendant 1 heure
20 sous agitation.

2/ Procédure pour la détermination :

- On dose la fraction soluble dans l'eau : 1,2 mg de matière organique sont solubilisés dans 75 μL d'eau.
 - On solubilise le culot restant après centrifugation dans 75 μL de NaOH
25 à 0,3 N.
 - On prélève 25 μL de chaque standard (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de chaque échantillon (préparés de la même manière que les échantillons à doser) et on les distribue dans les puits d'une plaque de 96 puits.
 - On couvre la plaque et on incube pendant 30 min. à 37°C .
 - On lit la densité optique à 562 nm une fois que la plaque est refroidie à température ambiante.
- 30

A titre de comparaison, la même expérience est réalisée sur un échantillon de corail brut (aragonite) et sur un échantillon de produit BIOCORAL®.

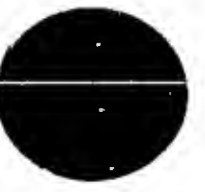
La figure 2 représente le rapport protéines/MB pour chacun des trois échantillons. On peut constater que le traitement "supercritique" selon l'invention permet d'obtenir du corail duquel environ deux fois plus de protéines ont été
5 extraites, comparé au produit BIOCORAL®.

Exemple 4 : Mise en évidence de la prolifération cellulaire de cellules osseuses sur le corail traité

On découpe des cylindres ($\varnothing=12$ mm) en disque d'un mm d'épaisseur à
10 l'aide d'une scie diamantée, puis on les stérilise par chaleur sèche à 100°C pendant 1h30 (3 cycles). Les disques sont déposés sur un lit d'aragose 0,1 % dans des boîtes de culture (NUNC ; 24 puits, 2 cm^2). La suspension cellulaire est déposée sur chaque disque à raison de $20\,000$ cellules MG63/ cm^2 ($1,13\text{ cm}^2 \times 2$
car porosité – $22\,600$ cellules soit environ $50\,000$ cellules par échantillon), dans
15 un volume de $100\text{ }\mu\text{L}$ de milieu de culture complet (IMDM : Iscowe's Modified Dubelcco's Medium, 10 % SVF – sérum de veau foetal). Après 30 minutes pour
laisser les cellules adhérer, on complète avec 1 ml de milieu. Le milieu est
changé tous les deux jours.

On enlève le milieu de culture complet et on rince avec du milieu seul. On
20 prive les cellules pendant 17 heures (milieu seul + 10 % de SVF, thymidine tritiée, $10\text{ }\mu\text{Ci/ml}$ (Réf : TRK 758 AMERSHAM), soit $10\text{ }\mu\text{L}$ de ^3HT /Volume de milieu complet). On élimine le surnageant (à conserver pour élimination ultérieure), puis on enlève le matériau de l'agarose et on le transfère dans un
puits en plastique. On rince deux fois avec du PBS 1X (ou du Hank's 1X), puis on
25 fixe les cellules avec du méthanol froid 100 %, pendant 10 min à 4°C . On rince deux fois avec du PBS 1X (ou du Hank's 1X), et on précipite avec du TCA froid 5 % pendant 20 minute à 4°C . On élimine le surnageant, et on rince quatre fois avec du PBS 1X (ou du Hank's 1X).

On incube dans NaOH 0,3 N pendant 2 heures à température ambiante
30 (dissolution de la couche cellulaire), sans dépasser 300 à $500\text{ }\mu\text{L}$ de NaOH. On récupère la solution dans un tube à scintillation auquel on rajoute 5 ml de liquide scintillant, et on détermine la radioactivité de la solution et du matériau à l'aide d'un compteur β (radioactivité négligeable).



A titre de comparaison, la même expérience est réalisée sur un échantillon de corail brut (aragonite) et sur un échantillon de produit BIOCORAL®.

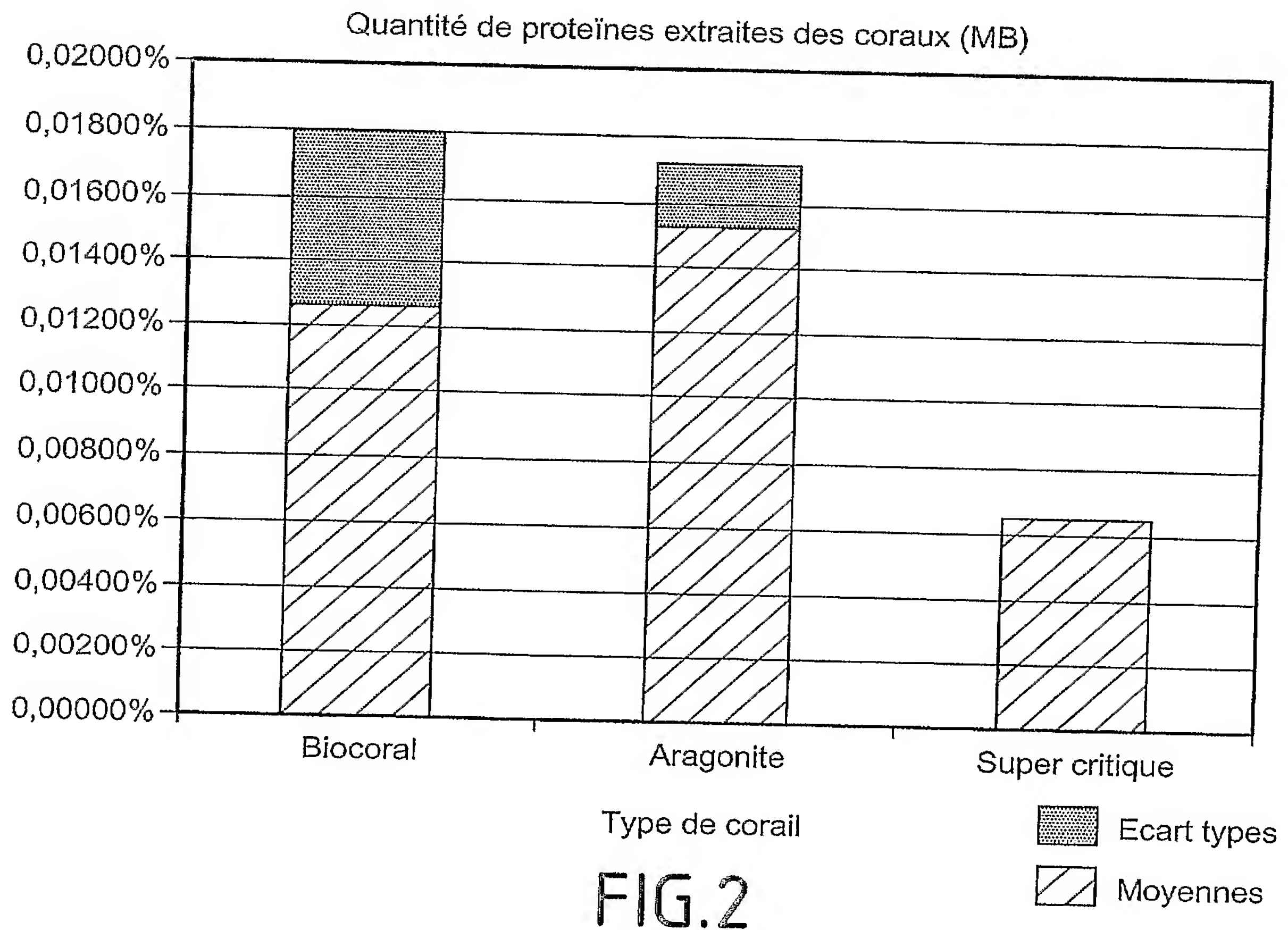
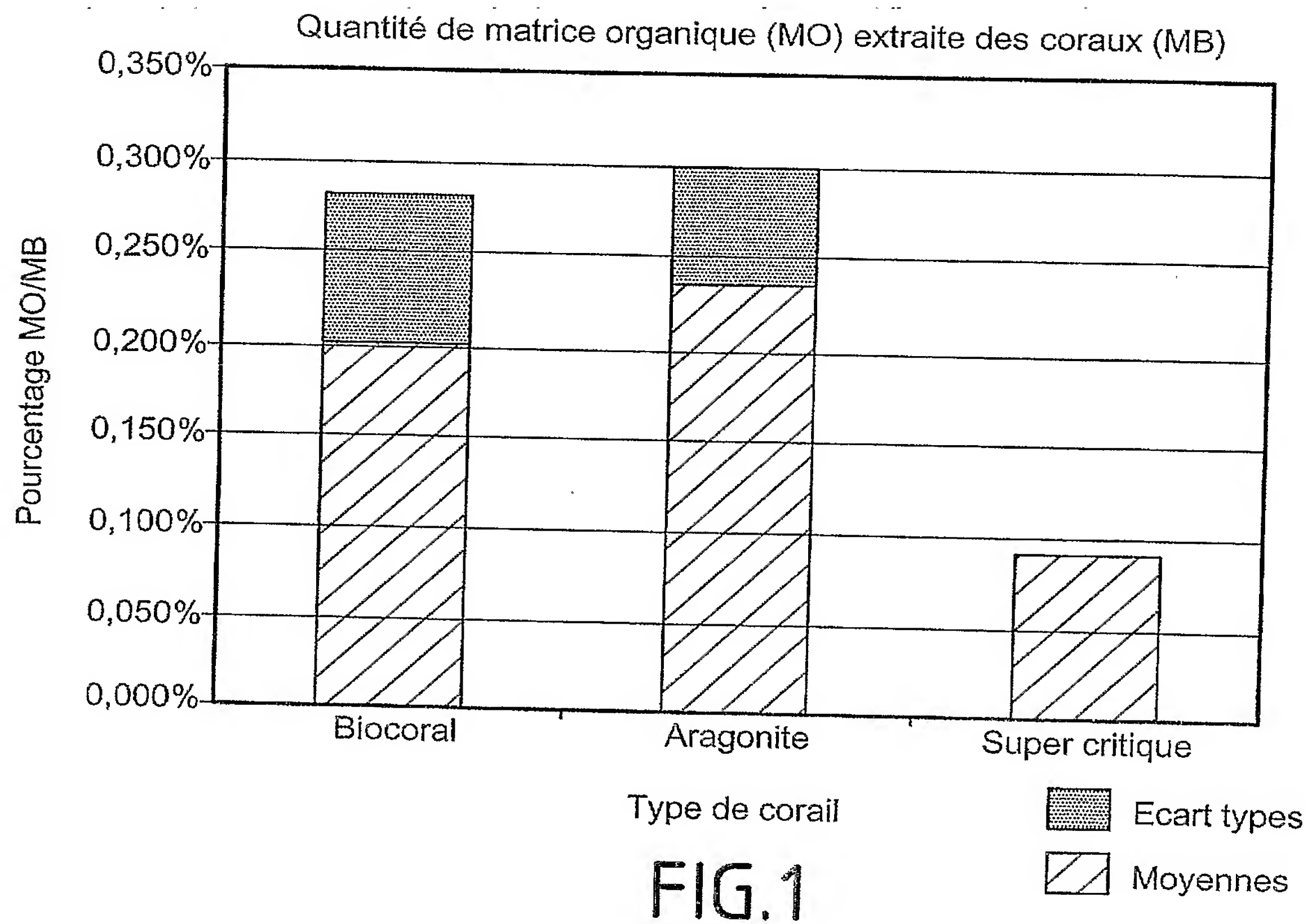
Les résultats sont présentés sur la Figure 3. On peut constater que la prolifération cellulaire des cellules MG63 sur le corail traité selon l'invention, est
5 identique à celle observée sur le produit BIOCORAL®.

L'ensemble de ces résultats suggère que le corail traité selon la présente invention peut être utilisé dans la fabrication de substituts osseux.

REVENDEICATIONS

1. Procédé d'extraction de substances organiques présentes dans le corail, qui consiste à traiter le corail par un fluide à une température inférieure à 270° C, de
5 préférence inférieure ou égale à 260° C, et de préférence encore inférieure ou égale à 250° C.
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel ledit fluide est choisi parmi l'éthanol, l'acétone, le dioxyde de carbone ou un mélange de fluide dont la
10 température critique est inférieure à 270° C, de préférence inférieure ou égale à 260° C, et de préférence encore inférieure ou égale à 250° C.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel ledit fluide est l'éthanol.
- 15 4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel le corail est traité à une pression comprise entre environ 100 à 300 MPa, de préférence entre 120 et 250 MPa.
5. Corail obtenu par le procédé selon l'une des revendications 1 à 4.
- 20 6. Substitut osseux fabriqué à partir du corail selon la revendication 5.

1/2



2/2

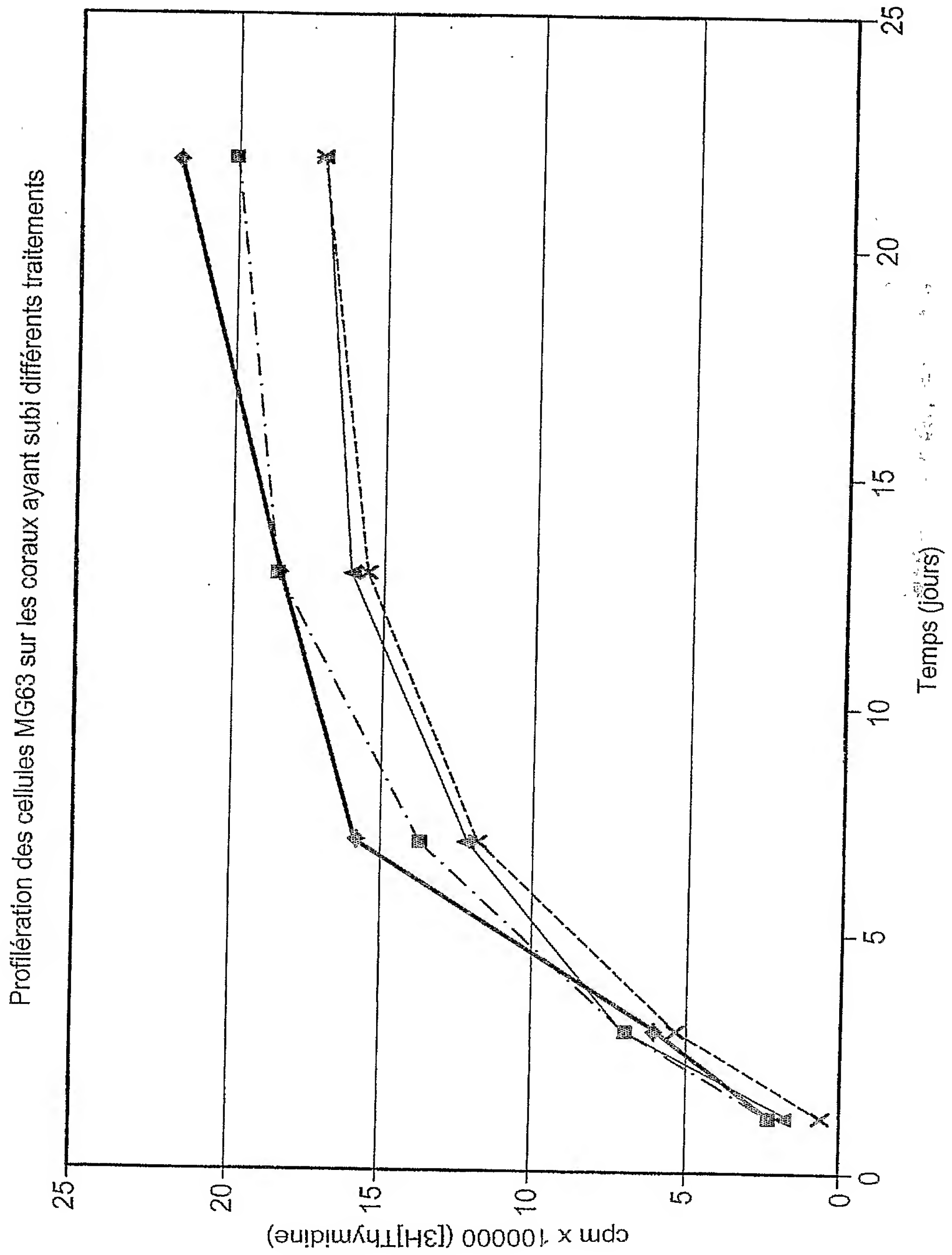


FIG.3



PCT/FR2004/003126

